

Magyar Néphadsereg Egészségügyi Szolgálat, Semmelweis Orvostudományi Egyetem Kór-
élettani Intézet*, és I. sz. Kórbonctani és Kísérletes Rákkutató Intézet**

Polimorfonukleáris granulocita-tumorsejt interakció hatása az aktív oxigéngyökök produkcióra

Dr. Fűrész József orvos százados, Dr. Budavári István, az orvostudományok kandidátusa*

Dr. Schweitzer Katalin, Dr. Pál Katalin, Dr. Lapis Károly**

Kulcsszavak: tumorsejt, oxigéngyök

Érkezett: 1985. 07. 01.

Szerzők vizsgálták az alacsony (LLT) és a magas (LLT-HH) metasztatizáló képességgel rendelkező tumorsejtek, valamint a tumoros és a kontroll állatokból származó PMN granulociták kemilumineszcenciáját. Megállapították, hogy: 1. a vizsgált tumormodell esetében a tumorbetegség nem változtatja meg a polimorfonukleáris granulociták kemilumineszcenciáját; 2. a tumorsejtek aktivált zymozán hatására a polimorfonukleáris granulociták kemilumineszcenciáját meghaladó fényt emittálnak; 3. nincs összefüggés a kemilumineszcencia mértéke és a metasztatizáló képesség között; 4. a tumorsejt és polimorfonukleáris granulocita együttes szuszpenzióban a kemilumineszcencia értéke a külön-külön mért értékek összegénél kisebb. Ez részben aspecifikus kompetitív hatás, részben specifikus kölcsönhatás mellett szól.

Az utóbbi évek vizsgálatai szerint a reaktív oxigéngyökök számos fiziológiás és patológiás folyamatban (arterioszklerózis, öregedés, carcinogenezis, sugárkárosodás stb.) döntő jelentőségű tényezőként jelentkeznek (9, 12, 13).

Kiemelkedő jelentősége van a reaktív oxigéngyököknek a szervezet fertőzések elleni védekezésében és a szervezet integritásának védelmében is. A fagocitózisa képes sejtek (polimorfonukleáris granulocita, monocita, makrofág stb.) ugyanis felismerik, majd bekebelezik az idegen partikulát, és elpusztítják azt. Ez utóbbi (ún. killing) mechanizmusban az emésztő fermenteken kívül jelentős szerepet játszanak a fagocitáló sejtek által termelt erősen reaktív oxigén származékok (szuperoxid anion: O_2^- , szinglet oxigén: 1O_2 , szuperaktív hidroxil gyök: $\cdot OH$, hidrogénperoxid: H_2O_2 , perhidroxilgyök: HO_2^-). Az aktív gyökök keletkezését a sejtek oxigénfogyasztásának nagyfokú növekedése, az ún. „respiratory burst” és a hexoze-monofoszfát

sönt aktiválódása kíséri (5, 21, 23, 28). A további vizsgálatok során kiderült, hogy a fagociták nemcsak a bekebelezett sejteket képesek elpusztítani ezzel az oxigéntől függő mechanizmussal. Először *Nathan* (15, 16) írta le, hogy a fagociták extracelluláris citotoxicitásában szerepe van az oxigén-dependens folyamatoknak. Az oxigén-dependens killing során (vagyis ahol a célsejtet valamely aktív oxigéngyök pusztítja el) a fagocitáló sejtek fényt emittálnak. Ez az ún. kemilumineszcencia (KL) jelensége, amely a redukált oxigén gyökök által aktivált carbonyl csoportok relaxációja során jön létre. Ily módon a KL mérése lehetővé teszi az oxigén-dependens killing mechanizmus érzékeny monitorizását anélkül, hogy a sejtet károsítanánk (1, 2, 24). A fagocitózisra képes sejtek, köztük a polimorfonukleáris (PMN) granulociták (a hagyományos nomenklatúra szerint ezek az érett granulocitáknak felelnek meg) is jelentős szerepet játszanak a tumor elleni védekezésben. Számos adat szól amellett, hogy ebben a folyamatban is kulcsszerepe van a szuperaktív oxigén származékoknak (6, 10, 11, 15). Ugyanakkor lehetséges az is, hogy a tumorsejtek által termelt szabadgyökök szerepet játszhatnak a tumor invazivitásában és a metasztatizáló képesség kialakulásában (3, 8, 22, 27).

Ilyen megfontolásból vizsgáltuk a C57B1/6 egértörzs PMN granulocitáinak és az ebben a törzsből fenntartott, eltérő metasztatikus potenciállal bíró Lewis Lung tumorszubpopulációk (LLT és LLT-HH) sejtjeinek kemilumineszcenciáját. (Az LLT-HH a LLT-ből szelektált megnövekedett metasztatikus képességű tumorvonal.) Vizsgáltuk, hogy milyen szerepet játszanak a szuperaktív O_2 származékok a tumorbetegség patogenezisében.

Az alábbi kérdésekre kerestünk választ:

1. A tumorbetegség során megváltozik-e a PMN granulociták szabadgyök termelő képessége, s ez kapcsolatban van-e a tumor metasztatizáló képességével? 2. Termel-e szuperaktív oxigéngyököt a tumorsejt és ha igen, összefügg-e ez a képessége a metasztatizáló képességgel? 3. Miként befolyásolja a szabadgyök képződést a PMN granulocita-tumorsejt interakció.

Anyag és módszerek

Tumorsejt nyérése:

A tumorvonal szelektálása, illetve fenntartása *Pál és munkatársai* szerint történt (19). Beltenyésztett C57B1/6 egér hátsó lábának izmába 10^6 LLT és 10^5 LLT-HH tumorsejtet injektáltunk. Az állatokat a 7. és a 10. napon öltük le. A tumort sztereo-mikroszkóp alatt izoláltuk, és TC 199-ben aprítottuk. Az aprítékot négyrétegű gézen átszűrve $1,08 \text{ g/cm}^3$ sűrűségű Percoll (Pharmácia) grádiensen centrifugáltuk (1000 fordulat/min, 10 perc), a sejt számot $5 \times 10^5/\text{ml}$ -re állítottuk be Dulbecco pufferben. A sejtek életképességét 0,1%-os eosin oldatban vizsgáltuk.

PMN granulocita nyérése:

Tumoros és kontroll állat peritoneális üregébe leülés előtt 6%-os dextrán (Ms: 200—300 000, Serva) oldatot injektáltunk, s a peritoneális folyadékot 2 óra múlva leszívtuk. A sejteket kétszer mostuk Dulbecco pufferben (1000 fordulat/min, 10 perc), a sejt számot $5 \times 10^5/\text{ml}$ -re állítottuk be a fenti oldattal.

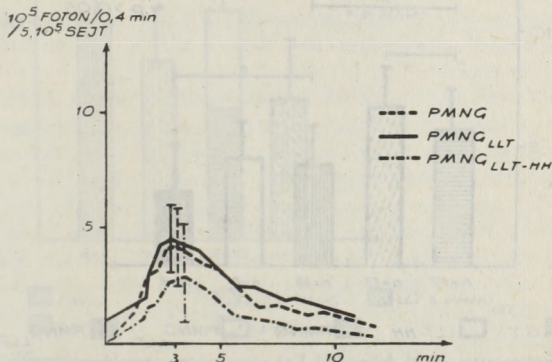
Opszonizálás:

Ez a partikulum „jelző-fehérjével” történő jelölése, mely elősegíti a fagocita és a részecske kapcsolódását. A komplement rendszer aktiválása, s ezáltal a zymozán C_{3b} -opszoninnal történő jelölése céljából 2 ml kontroll egér szérumot 30 mg zymozánnal (Sigma Chemic. Co. St. Luis) inkubáltunk 30 percig 37°C -on 30 ml Dulbecco pufferben. Centrifugálás után (900 ford/min, 5 perc), az üledéket 30 ml-re hígítottuk Dulbecco pufferben.

Kemilumineszcencia:

Meghatározása Van Dyke módszerével történt (26). A mérést Intertechnique LM—40 típusú folyadék scintillációs számlálóban végeztük. Az aktivált zymozán szuszpenzióhoz 2 ml, 6 mmol-os (10 mg%) luminol (Sigma Chemic. Co., St. Luis) törzsdodatot adtunk. A mérési elegy 1 ml tumor szuszpenziót, 2 ml zymozán szuszpenziót és 1 ml Dulbecco puffert tartalmazott. A tumorsejt és a PMN granulocita KL-jának egyidejű mérésénél az 1 ml Dulbecco puffert nem tettük a mérendő elegyhez. A kemilumineszcenciát $\text{foton}/0,4 \text{ min}/5 \times 10^5$, illetve 10^6 sejtre adjuk meg.

A statisztikai összefüggést Student-féle kettős t próbával vizsgáltuk.



1. ábra. Tumoros és kontrollállatból származó polimorfonukleáris granulociták kemilumineszcenciájának időbeli lefutása

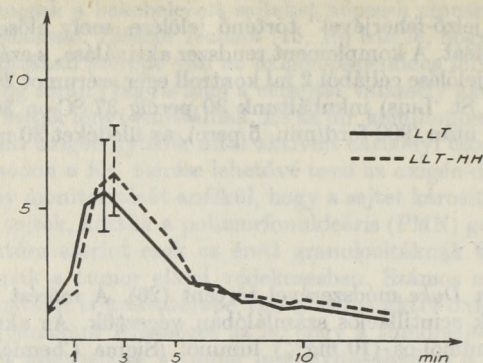
Eredmények

A kontroll és a tumoros állatokból izolált PMN granulociták opszonizált zymozán indukálta KL-ja hasonló időbeli lefutást mutat (1 sz. ábra).

Opszonizált zymozán jelenlétében az alacsony metasztatizáló képességű LLT és a magas metasztatizáló képességű LLT-HH variánsokból származó tumorsejtek luminol jelenlétében mérhető KL-t mutatnak. A KL időbeli lefutása hasonló a PMN granulociták KL görbéjének lefutásához (2. sz. ábra).

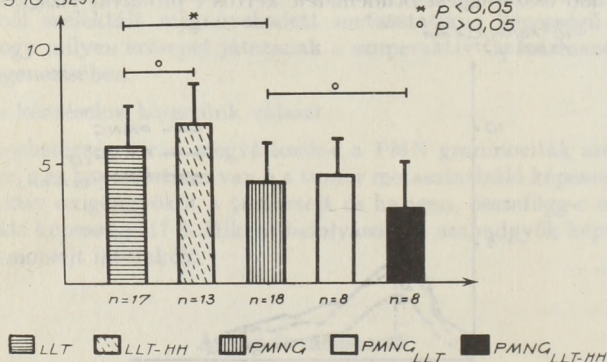
Összehasonlítva az egyes sejttípusok KL-jának csúcspontját azt látjuk, hogy a tumorsejtek opszonizált zymozán hatására szignifikánsan nagyobb KL-t produkálnak, mint a PMN granulociták ($p < 0,05$). Nincs különbség ugyanakkor az LLT és az LLT-HH vonalak sejteinek KL-ja ($p > 0,05$), illetve a kontroll és a tumoros állatokból származó PMN granulociták KL-ja között ($p > 0,05$) (3. sz. ábra).

10^5 FOTON/0,4 min
/ $5 \cdot 10^5$ SEJT



2. ábra. Tumorsejtek kemilumineszcenciájának időbeli lefutása

10^5 FOTON/0,4 min
/ $5 \cdot 10^5$ SEJT



3. ábra. Tumorsejtek és polimorfonukleáris granulociták kemilumineszcenciájának csúcserőértékei

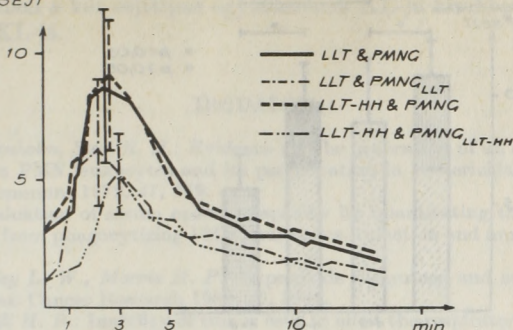
A tumorsejtek és a kontroll PMN granulociták, valamint a tumorsejtek és a tumoros állatból származó PMN granulociták keveréke által produkált KL ugyanolyan időbeli lefutást mutat mint az egyes sejtek esetében (4. sz. ábra).

Az LLT sejtek és a kontroll PMN granulociták külön-külön mért KL-jának összege 20%-kal magasabb, mint a két sejt populáció közös szuszpenziójának KL-ja, de a különbség nem szignifikáns ($p > 0,05$). Az LLT sejtek és a LLT-os állatokból származó PMN granulociták külön-külön mért KL-jának összege 39,5%-kal magasabb, mint a két sejt populáció közös szuszpenziójának KL-ja, a különbség szignifikáns ($p < 0,05$).

Az LLT és a kontroll PMN granulocita közös szuszpenziójának KL-ja 32,3%-kal magasabb, mint az LLT és a tumoros állatból származó PMN granulocita keverékének KL-ja, de a különbség nem szignifikáns ($p > 0,05$) (5. sz. ábra).

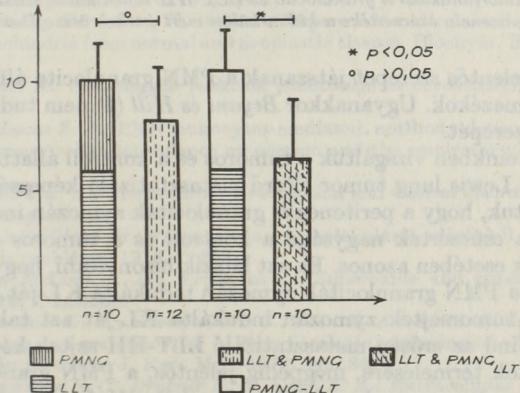
Az LLT-HH és a kontroll PMN granulociták külön-külön mért KL-jának összege 20%-kal magasabb, mint a két sejt típus keverékének KL-ja, az eltérés nem

10^5 FOTON/0,4 min
/ 10^6 SEJT



4. ábra. Tumoros vagy kontrollállatból származó polimorfonukleáris granulociták és tumorsejtek közös szuszpenziójának kemilumineszcenciája az idő függvényében

10^5 FOTON/0,4 min
/ 10^6 SEJT

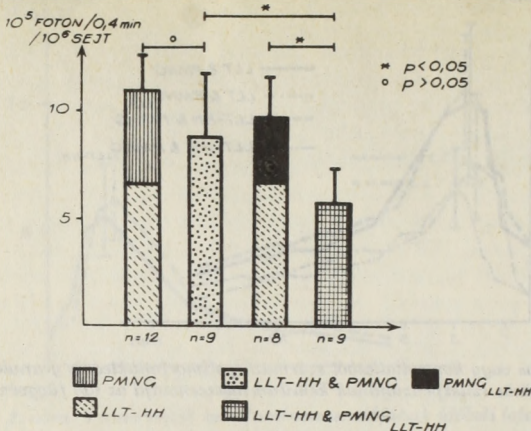


5. ábra. Polimorfonukleáris granulocita és LLT sejtek közös szuszpenziójának kemilumineszcencia csúcserőve a külön-külön mért értékek összegéhez viszonyítva

szignifikáns ($p > 0,05$). Az LLT-HH sejtpopuláció és a tumoros állatból származó PMN granulociták külön-külön mért KL-jának összege 41,3%-kal, szignifikánsan magasabb, mint ugyanezen sejtek keverékének KL-ja ($p < 0,05$). Az LLT-HH sejtek kontroll PMN granulocitákkal, ill. tumoros állatból származó PMN granulocitákkal együtt mért KL-ja között 35,3%-osszignifikáns különbség van ($p < 0,05$) (6. sz. ábra).

Következtetés

A PMN granulociták a mikroorganizmusok elleni védelem fontos láncszemét képezik. Ebben az antimikrobiális hatásban a reaktív oxigén gyökök szerepe bizonyítottan vehető. A PMN granulociták ezenkívül jelentős szerepet játszanak a tumor elleni védekezésben is. A killing (a célsejtet elpusztító) mechanizmus részletei azonban nem teljesen tisztázottak. Számos szerző (6, 7, 10) szerint az antitest mediálta



6. ábra. Polimorfonukleáris granulocita és LLT-HH sejtek közös szuszpenziójának kemilumineszcencia csúcserőke a külön-külön mért értékek összegéhez viszonyítva

tumorkillingben jelentős szerepet játszanak a PMN granulocita által termelt szuperaktív oxigén származékok. Ugyanakkor *Bryant és Hill* (4) nem tudta igazolni a „respiratory burst” szerepét.

Jelen kísérleteinkben vizsgáltuk a tumoros és a kontroll állatból származó PMN granulociták és a Lewis lung tumor eltérő metasztatizáló képességű két vonalának KL-ját. Azt találtuk, hogy a peritoneális granulociták zymozán indukálta KL-jának lefutása, illetve a csúcserőke nagysága a kontroll és a tumoros állatból származó PMN granulociták esetében azonos. Ez azt látszik bizonyítani, hogy a tumorbetegség nem befolyásolja a PMN granulociták zymozán indukálta KL-ját.

Megmérve a tumorsejtek zymozán indukálta KL-ját azt találtuk, hogy mind az LLT sejtek, mind az erősen metasztatizáló LLT-HH sejtek képesek szuperaktív oxigén származékok termelésére, mégpedig jelentős, a PMN granulocitákét meghaladó mennyiségben. Nincs azonban különbség a két eltérő metasztatizáló képességű tumor szubpopuláció sejtjeinek KL-jában. Ez amellest szól, hogy a tumorsejtek rendelkeznek az aktivált zymozán megkötéséhez szükséges C_{3b} receptorokkal, s ezen keresztül képesek — a szuperaktív oxigén derivátumok segítségével — a velük interakcióba lépő sejtek és a szubsztrátok roncolására. Ezen képességnek szerepe lehet az immunescape (a tumorsejtnek az immunvédekezés hatása alól való „kibújása”) és a tumor invázió jelenségében (17, 18, 20, 22).

A tumorsejt és a PMN granulociták együtt inkubálása során azt találtuk, hogy a mért KL érték kisebb, mint a külön-külön mért értékek összege. Feltehető, hogy a tumorsejt és a PMN granulocita között az aktív oxigén származékok produkációjában bizonyos fokú kompetíció jön létre. Hasonló következtetésekre jutott makrofágtumorsejt közös szuszpenziója vonatkozásában *Thomas és Fishman* (24) is.

Ezen jelenségek pontos mechanizmusának tisztázására még további vizsgálatokra van szükség, de úgy tűnik, hogy joggal feltételezhetünk egy aspecifikus és egy specifikus gátló mechanizmust. Az előbbi létezése mellett szól, hogy az LLT és a kontroll PMN granulocita, valamint az LLT-HH és a kontroll PMN granulocita keveréke mindkét esetben 20% körüli KL csökkenést mutatott. A specifikus gátló mechanizmust látszik alátámasztani az a tény, hogy a tumoros állatból származó PMN gra-

nulocita és a tumorsejt keveréke LLT esetében alig haladja meg az LLT KL-ját, sőt LLT-HH esetében a két sejttípus együttesének KL-ja kisebb, mint az LLT-HH önmagában mért KL-ja.

IRODALOM

1. Allen R. C., Stjernholm, Steel R. H.: Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human PMN leukocytes and its participation in bactericidal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972, 47, 679.
2. Allen R. C.: Evaluation of serum opsonic capacity by quantitating the irrital chemiluminescent response from phagocytizing PMN leukocytes. *Infection and immunity.* 1977, 15(3), 828.
3. Bize J. B., Oberley L. W., Morris H. P.: Superoxide dismutase and superoxide radical in Morris Hepatomas. *Cancer Research* 1980, 40, 3686.
4. Bryant S. M., Hill H. R.: Inability of tumor cells to elicit the respiratory burst in cytotoxic activated macrophages. *Immunology* 1982. 45:577
5. Budavári I.: A gyulladás molekuláris patológiája. *Medicina*, 1983, Budapest.
6. Clark R. A., Klebanoff S. J., Eizenstein A. B., Fefer A.: Peroxidase $-H_2O_2-$ halide system: Cytotoxic effect on mammalian tumor cells. *Blood* 1975, 45, 161.
7. Clark R. A., Klebanoff S. J.: Neutrophil-mediated tumor cell cytotoxicity: role of the peroxidase system. *J. Exp. Med.* 1975, 141, 1442.
8. Dionisi O., Galeotti T., Terranova T., Azzi A.: Superoxide radicals and hydrogen peroxide formation in mitochondria from normal and neoplastic tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 1975, 403, 292.
9. Fehér J. és Vereckei A.: Szabadgyök reakciók jelentősége az orvostudományban. *Medicina*, 1985, Budapest.
10. Haferman D. H., Lucas Z. J.: PMN leukocytes-mediated, antibody-dependent, cellular cytotoxicity against tumor cells: dependence on oxygen and the respiratory burst. *J. Immunol.* 1979, 123, 55.
11. Klebanoff S. J., Clark R. A.: The neutrophil: Function and clinical disorders. North-Holland Publ. Co., 1987, Amsterdam.
12. Dr. Matkócs B., Szöllősné dr. Varga Ilona: A molekuláris oxigénből keletkező gyökök. A biológia aktuális problémái 1976, 7, 203.
13. Michelson A. M., McCord J. M., Fridovich J.: Superoxide and superoxide dismutases. Academic Press, 1977, London.
14. Nathan C. F., Bruckner L. H., Silverstein S. C., Cohn Z. A.: Extracellular cytotoxicity by activated macrophages and granulocytes. I. Pharmacologic triggering of effector cells and the release of hydrogen peroxide. *J. Exp. Med.* 1978, 149, 84.
15. Nathan C. F., Silverstein S. C., Bruckner L. H., Cohn Z. A.: Extracellular cytotoxicity by activated macrophages and granulocytes. II. Hydrogen peroxide as a mediator of cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 1979, 149, 100.
16. Nathan C. F., Murray H. V., Cohn Z. A.: The macrophage as an effector cell. *New Eng. J. Med.* 1980, 303, 622.
17. Normann S. J., Sorkin E.: Inhibition of macrophage chemotaxis by neoplastic and other rapidly proliferating cells in vitro. *Cancer Res.* 1977, 37, 705.
18. OTu A. A., Russell R. J., Wilkinson P. C., White R. G.: Alteration of mononuclear phagocyte function: induced by Lewis Lung carcinoma in C5 + BL mice. *Br. J. Cancer* 1977, 36, 330.
19. Pál K., Kopper L., Lapis K.: Increased metastatic capacity of Lewis Lung tumor cells by in vivo selection procedure. *Invasion, Metastasis* 1983, 3, 174.
20. Rhodes J., Bishop M., Benfield J.: Tumor surveillance: how tumors may resist macrophage-mediated host defense. *Science*, 1979, 203, 179.
21. Rossi F., Romeo D., Patriarca P.: Mechanism of phagocytosis-associated oxidative metabolism in PMN leukocytes and macrophages. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 1972, 12, 127.
22. Sbarra A. J., Karnovsky M. L.: The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during ingestion of particles by PMN leukocytes during phagocytosis. *J. Biol. Chem.*, 235, 2224.
23. Sacks T., Moldow C. F., Craddock P. R., Bowers T. K., Jacob H. S.: Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocyte: An in vitro model of immunovascular damage. *J. Clin. Invest.* 1978, 61, 1161.
24. Thomas E. L., Fischman M.: Hydrogen peroxid release by rat peritoneal macrophages in the presence and absence of tumor cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 1982, 215, 355.

25. Turner S. R., Campbell J. A., Lynn W. S.: Polymorphonuclear leukocyte chemotaxis toward oxidized lipid components of cell membranes. *J. Exp. Med.* 1975, 141, 1437.
26. Dyke K. V., Dyke C. V., Udeinya J., Brister C., Wilson M.: A new screening system for non-steroidal antiinflammatory drugs based upon inhibition of chemiluminescence produced from human cells (granulocytes). *Clin. Chem.* 1979, 25, 1656.
vascular damage. *J. Clint. Invest.* 1978, 61, 1161.
27. Zbarsky J. B., Peskin A. V.: Superoxide dismutase activity and the formation of superoxid radicals by membranes in tumor and normal tissue. *Vesztnyik Akad. Med. Nauk.*, 1982, 9, 24.
28. Weiss S. J.: Oxygen as a weapon in the phagocyte armamentum. *Immunology of inflammation* (Ed P. A. Ward, Elsevier, 1983) c. könyvben, 37.

Capt. J. Fűrész M.D.M.C., L. Budavári M.D., K. Schweitzer, K. Pál, K. Lapis M.D.D.Sc.:

EFFECT OF PMNG AND TUMOR CELLS INTERACTION ON THE ACTIVE OXYGENE RADICAL PRODUCTION

The authors investigated chemiluminescence (CL) of Lewis lung tumor cell line (LLT) and its subpopulation with increased metastatic capacity (LLT-НН) and chemiluminescence of polymorphonuclear granulocytes (PMNG) of tumorous and control animals. It has been found that 1. by the given model, the tumorous disease does not change the CL of PMNG; 2. under the influence of activated zymozane, tumor cells show a higher light emission than the CL of PMNG; 3. there is no relation between the intensity of CL and the metastatic capacity; 4. tumor cells and PMNG in a common suspension give lower CL than the sum of each separately. These findings are indicative of a non-specific competitive effect on one hand and of a specific interaction on the other.

Капитан м/с Й. Фюрес, И. Будавари, К. Швейцер, К. Пал, К. Ланш:

ВЛИЯНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПОЛИМОРФОНУКЛЕРАНЫХ ГРАНИУЛОЦИТОВ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НШ ПРОИЗВОДСТВО АКТИВНОГО КИСЛОРОДНОГО РАДИКАЛА

Авторы исследовали хемилюминесценцию (ХЛ) опухолевых клеток ЛЛТ с низкой и высокой метастатической способностью и хемилюминесценцию полиморфонуклеарных гранулоцитов (ПМНГ), взятых из животных с опухолями и из контрольных животных. Было установлено, что 1. при данной модели опухоли раковая болезнь не изменяет ХЛ ПМНГ; 2. под действием активированного измозана опухолевые клетки излучают свет более сильный, чем ХЛ ПМНГ; 3. интенсивность ХЛ и метастатическая способность не показывают никакой взаимосвязи; 4. опухолевые клетки и ПМНГ в общей взвеси дают более низкое значение ХЛ, чем сумма каждых в отдельности. Это свидетельствует с одной стороны о неспецифическом конкуритивном действии и, с другой стороны, о специфическом взаимодействии.